

Public health aspects of bacterial resistance in food animals

Citation for published version (APA):

van den Bogaard, A. E. J. M. (2000). *Public health aspects of bacterial resistance in food animals*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht.
<https://doi.org/10.26481/dis.20001222ab>

Document status and date:

Published: 01/01/2000

DOI:

[10.26481/dis.20001222ab](https://doi.org/10.26481/dis.20001222ab)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

“De roos heeft gauw gedaan, de doornen blijven staan.”

(Roses wither soon, but their thorns remain.)

Jacob Cats (1577 – 1660), Dutch statesman, poet and moralist.

Antibiotics are the most effective and safest drugs ever developed. Their efficacy as therapeutics is, however, threatened by the emergence of antimicrobial resistance in pathogenic bacteria.

In the introduction the reasons for the antimicrobial resistance problems encountered today in (potentially) pathogenic bacteria are discussed. This seems to be the result of an important unwanted side effect of antibiotics. Because these drugs are not selective they kill not only pathogenic bacteria, but all susceptible bacteria that they encounter. This results not in a decrease of bacterial numbers, because susceptible bacteria are replaced by unsusceptible species and strains with acquired resistance. This is called selection of resistance. Because resistant bacteria exchange genes conferring resistance relatively easily, the lavish use of antibiotics in human and veterinary medicine, animal husbandry and agriculture, has caused an enormous increase of resistant bacteria in the intestinal flora of man and other animals, which are excreted into the environment. These resistant bacteria form an enormous reservoir of resistance genes for (potentially) pathogenic bacteria. Resistant bacteria of food animals can reach the intestinal tract of humans either directly or via the food chain. In the case of pathogenic bacteria this is a cause of zoonotic food borne infections like salmonellosis, but non-pathogenic species might either colonise the human intestinal tract or transfer their resistance genes to bacteria of the human intestinal flora. This is called dissemination of resistance. Despite that resistance is an inevitable sequel of antibiotic use, it can be limited by decreasing the selection pressure i. e. using less antibiotics (read: use them only if necessary) and by prevention of dissemination of resistant bacteria by improving hygiene and sanitation.

In chapter I the usage of antibiotics in animals is attended to. Antibiotics are given to animals not only for therapy, control and prevention of bacterial infections on prescription of a veterinary surgeon, but also continuously added as antimicrobial growth promoter (AMGP) to feeds of food animals to enhance growth, feed digestion and performance and to decrease animal waste. In the EU and the USA approximately 50% of all antibiotics (kg active ingredient at 100% purity) are used for animals and more than 95% of these antibiotics are given to animals producing food for human consumption. However, large differences between countries exist. The selection pressure on animal bacteria by therapeutic antibiotics and AMGP is high, which causes not only resistance in animal pathogens, but also in zoonotic pathogens and in the intestinal flora of these animals. As to the extent to which antibiotic use in animals contributes to antibiotic resistance in humans is still under debate, the literature on this aspect is reviewed. Clonal spread of antibiotic resistant bacteria such as *E. coli*, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. and enterococci from food animals to humans has been described as well as transfer of resistance genes of animal bacteria to the human endogenous flora and human pathogens. At this moment the only way to minimise this public health risk is to use fewer antibiotics in food animals. Stopping the mere economic use of antibiotics as AMGP would diminish the overall use in animals by 30% - 50%.

In chapter II ways to minimise the use of antibiotics in veterinary medicine without hampering optimal veterinary care are discussed. This might be done by developing a veterinary antibiotic policy or prudent use guidelines for optimising the use of antibiotics by, or under supervision of, veterinary surgeons, also taking into account prevention of selection and dissemination

of resistant bacteria. The backbone of such a policy is the establishment of antibiotic formularies or guidelines: preferred and limited lists of antibiotics for more than 90% of the indications for which antibiotic therapy is warranted and regularly encountered in veterinary practice. If several antibiotics can be used, a formulary must differentiate between first, second and third choice antibiotics. Antibiotics that are very important in human medicine or that are analogues of such antibiotics are always third choice antibiotics. They can only be used after susceptibility testing has shown that first or second choice antibiotics are not effective. Such practical clinical guidelines are not only of great help to veterinary surgeons but also prevent policies and prudent use guidelines of becoming a dead letter or only a politically intended lip service. The need for continuous surveillance of antibiotic resistance and use in animals is discussed as being essential a key factors for evaluation of the impact of formularia and a timely adaptation of the formulary recommendations, and to provide an early warning system for new resistance problems that might occur.

In the following chapters the prevalence and degree of resistance in faecal indicator bacteria: *E. coli* and enterococci were used to detect selection and dissemination of resistant bacteria and resistance genes among animals and from food animals to the human intestinal flora. The prevalence (%) of resistance against a certain antibiotic is the number of samples containing bacteria (*Escherichia coli* or enterococci) resistant against that antibiotic divided by the total number of samples and multiplied by 100. The degree of resistance (%) against an antibiotic in a faecal sample is the percentage of *E. coli* or enterococci resistant to that antibiotic relative to the total number of *E. coli* or enterococci present in a sample.

In chapter III the prevalence and degree of antibiotic resistance of the faecal indicator bacteria: *E. coli* and enterococci, were determined in faecal samples of pigs collected at five Dutch abattoirs and in samples of Swedish pigs. In the Dutch pig populations the prevalence and degree of resistance both of *E. coli* and enterococci were high for antibiotics regularly used in pig medicine or as AMGP. Differences were observed between the five abattoirs, but could not be explained as no data on antibiotic consumption of the different

pig populations could be obtained. In the Swedish samples the resistance of enterococci against antibiotics used as AMGP was significantly lower than in the Dutch populations and avoparcin resistance was even absent. This was to be expected as Sweden had already banned the use of AMGP in 1986. The overall lower prevalence and degree of resistance against therapeutically used antibiotics observed in the Swedish pig samples compared to the Dutch pig populations, clearly indicated that banning the use of antibiotics as AMGP does not inevitably cause a higher therapeutic use of antibiotics in pigs. Moreover comparison of the results of the Swedish and Dutch samples showed that monitoring the prevalence and degree of resistance in faecal samples collected at slaughterhouses can be used to detect differences in antibiotic consumption between different pig populations.

In chapter IV the prevalence and degree of resistance against antibiotics commonly used for therapy or as AMGP in poultry were determined in the faecal flora of turkeys and three human populations, each with a different level of contact with turkeys: turkey farmers, turkey slaughterers and (sub)urban residents, was described. The prevalence of vancomycin resistant enterococci (VRE) was significantly higher (62%) in turkeys fed avoparcin than in turkeys not exposed to this drug (8%). No significant differences between farmers using avoparcin (37%) and those who did not (42%) were observed. The prevalence in turkey slaughterers and (sub)urban residents was 20% and 13% respectively. The Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) patterns of the isolated VRE in the different populations were quite heterogeneous, but isolates with the same pattern (similar genotypes) were found among turkey and turkey farmer isolates. On two occasions *Enterococcus faecium* isolates with identical PFGE patterns were found in the faeces from the farmer and turkeys of the same farm, which in addition, contained an indistinguishable *VanA* containing element not found in human isolates before. This strongly suggested transfer of resistant enterococci from animals to humans. Moreover similar *VanA* elements were not only found in isolates with the same PFGE patterns, but also in other strains isolated from humans and turkeys, which indicated that not only did clonal spread of resistant strains occur, but also a spillover of resistance genes of

turkey enterococci to enterococci in the human intestinal flora.

In chapter VI the prevalence and degree of antibiotic resistance of enterococci in the faecal flora of two chicken populations, i.e. laying hens with a low, and broilers with a high exposure to antibiotics were determined and likewise in faecal samples of laying hen farmers, broiler farmers and poultry slaughterers. The prevalence and degree of resistance for most antibiotics tested was higher in broilers than in laying hens, and in broiler farmers and broiler slaughterers than in laying hen farmers. Hence a clear correlation was found between the prevalence and degree of resistance found in faecal enterococci and the amounts of antibiotics the chicken populations were exposed to. Among the human populations there was no difference in antibiotic consumption and the observed prevalence and degree of resistance correlated with these parameters in the animals they were in contact with. The overall prevalence of resistance of faecal enterococci was significantly higher in broilers and broiler slaughterers than in laying hen farmers. The PFGE patterns of the isolated VRE (one per VRE positive faecal sample) of the five populations were quite heterogeneous, but in two cases *Enterococcus hirae* with identical PFGE patterns were isolated from the farmer and from broilers from the same farm. Moreover, similar *VanA*-elements were not only found in isolates with the same PFGE-patterns but also in other VRE isolated from humans and chickens. These results strongly indicate transmission of resistant enterococci from poultry to man, both by clonal spread and by transposon transfer from animal strains to enterococci in the human intestinal flora.

In chapter VI the prevalence and degree of resistance of *E. coli* were determined in faecal samples of three poultry populations: broilers and turkeys commonly exposed to antibiotics and laying hens with a low usage of antibiotics. In addition faecal samples of five human populations were examined: turkey and broiler farmers, laying hen farmers and broiler slaughterers and turkey slaughterers. The antibiotics tested or analogues are commonly used in poultry medicine. Ciprofloxacin resistant isolates from these 8 populations and from poultry meat samples were genotyped by PFGE. The prevalence and degree of resistance was significantly higher in turkeys and broilers than in the

laying hen population. Also for most antibiotics the observed resistance in faecal *E. coli* of turkey and broiler farmers, and of turkey and broiler slaughterers, was higher than in laying hen farmers. The same resistance patterns were found in turkey, turkey farmer and turkey slaughterer isolates, and in broiler, broiler farmer and broiler slaughterer isolates. Multiresistant isolates were common in turkey and broiler farmers but absent in the laying hen farmer population. The PFGE patterns of the isolates from the eight populations were quite heterogeneous, but on two occasions *E. coli* strains with an identical PFGE pattern were isolated from turkeys and the farmer from the same farm, and also from a broiler and a broiler farmer but from two different farms. Moreover, three *E. coli* isolates from turkey meat were identical to faecal isolates from turkeys. The results of this study strongly suggest that transmission of resistant clones of *E. coli* and resistance plasmids from poultry strains to human *E. coli* does commonly occur.

In chapter VII another approach, different from reducing antibiotic usage, to lower the prevalence and degree of resistance in faecal *E. coli* of food animals, was investigated. The "plasmid curing effect" of an AMGP: flavophospholipol, which had been described to occur *in vitro* and *in vivo* under experimental conditions, was studied under field conditions. The prevalence and degree of resistance of the indicator bacteria *E. coli* and enterococci, were determined in faecal samples of three groups of pigs being fattened at the same farm. During the last 12 weeks before slaughtering, one group received feed without any AMGP (negative control group), another group was given the same feed with 9 mg/kg flavophospholipol (study group) and the third group the same feed with 15 mg/kg avoparcin (positive control group). Faecal samples of each pig were collected at the start and at the end of the study and assessed for the prevalence and degree of resistance against antibiotics or analogues, either commonly used for therapy in pig medicine or as AMGP. Before the start of the study all pigs were colonised with multiresistant *E. coli* by mixing three resistant pig isolates through their feed.

The overall prevalence and degree of resistance of *E. coli* in the faecal flora increased significantly during the study in the negative control group and avoparcin ex-

posed group, but in the flavophospholipol group levels remained the same as at the start of the study. Before the study, in all three groups, the numbers of VRE were below the detection limit of the used isolation methods. At the end of the study the prevalence of vancomycin resistance was 44% and 41% in the negative control and flavophospholipol group respectively but only very low numbers of VRE per gram faeces were found. In the avoparcin fed group the prevalence was 72% and in 57% of the samples the majority of all enterococci present were vancomycin resistant. It was concluded that flavophospholipol under the study conditions effectively suppresses the amplification and dissemination of multiresistant *E. coli* in the intestinal flora of fattening pigs and that avoparcin use strongly selects for VRE. After confirmation of this effect of flavophospholipol in a large field study including several different farms, the significantly lower prevalence and degree of resistance of faecal *E. coli* in flavophospholipol fed animals might in a risk-benefit analysis outweigh the small increase of the risk of transfer of flavophospholipol resistant *E. faecalis* from animals to humans via the food chain. In chapter VIII the effect of the suspension of avoparcin usage as AMGP in the Netherlands in 1997 was assessed. The prevalence and degree of enterococci against three antibiotics important for human therapy and closely related to and cross resistant with three commonly used AMGP were analysed in faecal samples of pigs and broilers collected at the same slaughterhouses in 1997 and 1999, and from healthy human (sub)urban residents from the same cities and collected in the same years. The prevalence of VRE decreased significantly in all three populations. Erythromycin resistance did not change, but dalfopristin-quinupristin resistance had declined, despite the fact that the use of the related AMGP i.e. virginiamycin, was not forbidden at that time. Virginiamycin, however, was in short supply in the Netherlands in 1998 and 1999, because of production problems. These results indicate that continuation of the ban in the Netherlands on the use of avoparcin in animal feeds will not only eradicate VRE from food animals but also from the human population. Because of cross-resistance with macrolides and lincosamides, which are both commonly used in human and veterinary medicine, complete disappearance of pristina-

mycin resistance after a ban of virginiamycin is less likely to occur. The use of vancomycin in humans had not changed between 1997 and 1999. Therefore the results of this study again show that use of antibiotics in food animals not only causes resistance in the intestinal flora of these animals but that these resistant bacteria or their resistance genes are transferred to humans via the food chain.

In the discussion it is concluded that 60 years of lavish usage of antibiotics in human and veterinary has progressively eroded the clinical efficiency of antibiotics because of a rising tide of acquired resistance in pathogenic bacteria. However resistance in pathogens is only the top of the resistance iceberg and an enormous reservoir of resistance genes has accumulated in the intestinal flora of man and other animals. Fortunately there is a growing national and international concern about the increasing resistance and the need for more concerted action to prevent, delay and control bacterial resistance against antibiotics is generally recognised. In addition to other studies in the literature, the studies in this thesis show clearly that man and animals share a common pool of resistant bacteria and resistance genes and that resistant bacteria from food animals can reach humans either directly or via the food chain. Because antibiotic use in animals selects for bacterial resistance in the endogenous flora of these animals, it is logical to accept, as has been proven, that antibiotic use in animals contributes to certain resistance problems in human medicine. This makes control of antibiotic use in food animals not only of importance for maintaining the clinical efficacy of antibiotics in veterinary medicine, but also as a public health issue. Therefore a low prevalence and degree of antibiotic resistance in the faecal flora of food animals is to be considered as a safety and quality benchmark for food animals. This goal can only be achieved by lowering the need for therapeutic antibiotics in these animals and by stopping to use them for mere economic reasons as AMGP. These measures alone, however, will by no means solve resistance problems in human medicine, as the major cause of resistance in human pathogens is the (over)use of antibiotics in humans. It is fruitless, however to apportion blame. A more productive approach for all sectors involved is to agree upon strategies to prevent the loss of these important drugs from our thera-

peutic armament. With the strict adherence to a veterinary antibiotic policy, agreed upon by consensus, and the phasing out of AMGP usage the veterinary and animal production sectors in The Netherlands have clearly shown to take their responsibility for public health seri-

ously. Additional decontamination of animal carcasses after slaughtering might decrease the risk of transfer of bacterial resistance and of zoonotic infections like salmonellosis, from animals to humans even further.

Samenvatting

“De roos heeft gauw gedaan, de doornen blijven staan.”

Jacob Cats (1577 – 1660), staatsman, dichter en moralist.

Antibiotica zijn de meest effectieve en veilige geneesmiddelen, die we kennen. Hun werkzaamheid dreigt echter af te nemen door de antimicrobiële resistentie, welke in toenemende mate bij pathogene bacteriën voorkomt.

In de inleiding wordt deze resistentie-problematiek besproken. De belangrijkste ongewenste bijwerking van antibiotica is dat zij niet alleen (potentieel) pathogene bacteriën doden of in hun groei remmen, maar iedere gevoelige bacterie. Dit heeft echter geen daling van het totaal aantal bacteriën tot gevolg, omdat de gedode gevoelige bacteriën onmiddellijk vervangen worden door resistent geworden bacteriën en door ongevoelige soorten. Dit wordt selectie genoemd.

Bacteriën kunnen bovendien onderling relatief gemakkelijk genen, die coderen voor resistentie-eigenschappen, uitwisselen. Als gevolg van het jarenlange kwistig gebruik van antibiotica in de (dier)-geneeskunde, veeteelt en landbouw zijn de aantallen resistente bacteriën in de darmflora van mens en dier en in het milieu enorm toegenomen. Deze resistente commensale bacteriën vormen een reservoir van resistentie-genen voor (potentieel) pathogene bacteriën. Resistente bacteriën uit de darmflora worden bovendien uitgescheiden met de faeces. Omdat tijdens het slachtproces vlees veelal besmet wordt met darmbacteriën van slachtdieren, kunnen mensen niet alleen door direct contact besmet worden met resistente bacteriën, afkomstig van slachtdieren, maar ook indirect via voedingsmiddelen van dierlijke oorsprong. Wanneer het pathogene bacteriën zoals salmonellae betreft, zal dit vaak een (voedsel)infectie veroorzaken. Echter in geval van andere niet-pathogene bacteriën uit de darmflora van dieren kunnen mensen ongemerkt door deze resistente bacteriën gekoloniseerd worden of kunnen deze bacteriën hun resistentie-genen aan bacteriën van de

darmflora van de mens overdragen. Dit heet verspreiding van resistentie.

Ondanks het feit dat selectie en verspreiding van resistentie onvermijdelijk gevolgen zijn van het gebruik van antibiotica, kunnen de gevolgen beperkt worden door de selectiedruk te verminderen door minder antibiotica te gebruiken (lees: antibiotica alleen te gebruiken indien noodzakelijk). Verspreiding kan men voorkomen én door vermindering van het antibioticum gebruik én door het verbeteren van de hygiëne en sanitaire maatregelen. Bij producten van dierlijke oorsprong betekent dit decontaminatie van karkassen na het slachten, een goede hygiëne in slagerijen en keukens, en verhitting van het eindproduct voor consumptie.

In hoofdstuk I wordt het gebruik van antibiotica bij dieren besproken. Antibiotica worden aan nutsdieren niet alleen toegediend voor behandeling en preventie van bacteriële infecties op voorschrift van de dierenarts, maar ook continu door het veevoer gemengd als antimicrobiële groeibevorderaar (AMGB) om de groei te bevorderen, de voederconversie te verbeteren en de mestproductie te verminderen. Ongeveer de helft van alle antibiotica (kg actieve stof) wordt in de EU en in de USA gebruikt voor dieren en meer dan 95% hiervan is bestemd voor dieren die voedsel produceren voor menselijke consumptie, zogenaamde nutsdieren. De selectiedruk door antibioticagebruik bij nutsdieren is dus hoog. Dit veroorzaakt niet alleen resistentie bij bacteriën, die pathogeen zijn voor dieren, maar ook bij zoönotische bacteriën en bij bacteriën die behoren tot de normale darmflora van nutsdieren.

Omdat het nog niet duidelijk is in welke mate deze resistentie-selectie door antibioticagebruik bij dieren bijdraagt aan de resistentie-problematiek bij de mens, zijn de bestaande gegevens uit de literatuur over dit onderwerp samengevat en geëvalueerd. Klonale verspreiding van resistente bacteriën zoals *E.coli*, *Salmo-*

nella spp., *Campylobacter* spp. en enterokokken van nutsdieren naar mensen is bewezen en blijkt regelmatig voor te komen. Echter ook overdracht van resistentie-genen van faecale bacteriën van nutsdieren naar de darmflora van mensen en voor mensen pathogene bacteriën is aangetoond. De enig haalbare manier om dit risico voor de volksgezondheid te reduceren is om minder antibiotica aan nutsdieren te geven. Stoppen met het gebruiken van antibiotica als AMGB om puur economische redenen zou het totale antibioticumgebruik bij dieren in één keer met 30%-50% verminderen.

In hoofdstuk II worden mogelijkheden besproken om het diergeneeskundig gebruik van antibiotica te verminderen zonder het welzijn van dieren te schaden. Een belangrijke stap in dit proces is het opstellen van een veterinair antibioticumbeleid of richtlijnen voor het zorgvuldig gebruik van antibiotica. Een antibioticumbeleid is erop gericht om het gebruik en voorschrijven van antibiotica door dierenartsen te optimaliseren door regels op te stellen betreffende indicaties voor antibioticagebruik. Een essentieel onderdeel is het opstellen van formularia: richtlijnen, waarin voor meer dan 90% van de indicaties in de veterinaire praktijk adviezen worden gegeven of, en zo ja, welk antibioticum bij voorkeur gebruikt moet worden. Bij de keuze dient men naast effectiviteit ook rekening te houden met de kans op resistentie-ontwikkeling met het doel om deze zoveel mogelijk te voorkomen. Het aantal geadviseerde antibiotica is zoveel mogelijk beperkt en, indien voor een indicatie meerdere antibiotica geschikt zijn, wordt een volgorde aangegeven van middelen van eerste, tweede of derde keuze. Antibiotica, die gebruikt worden voor de behandeling van levensbedreigende infecties bij mensen en waarvoor geen alternatieven (meer) bestaan, zijn in diergeneeskundige formularia altijd derde keuze middelen. Deze mogen alleen gebruikt worden als bacteriologisch onderzoek heeft uitgewezen dat de verwekker niet gevoelig is voor een eerste of tweede keuze antibioticum. Dergelijke praktische richtlijnen zijn niet alleen erg handig voor praktiserende dierenartsen, maar verhinderen ook dat het antibioticumbeleid verwatert en een dode letter wordt. Ook wordt daardoor voorkomen dat een antibioticumbeleid of richtlijnen voor zorgvuldig antibioticumgebruik alleen worden geformuleerd om politiek move-

rende redenen en zo ontaarden in een opportunistische lippendienst. Op de noodzaak van een continue surveillance van resistentie in bacteriën geïsoleerd uit zieke dieren en faecesmonsters van slachtdieren, en van het antibioticumgebruik bij dieren wordt gewezen, omdat dit essentiële voorwaarden zijn voor een goed antibioticumbeleid. Door de gegevens uit deze surveillance regelmatig te analyseren kan het effect van de formularium-adviezen gemeten worden en kunnen, indien nodig, de adviezen aangepast worden. Bovendien worden hierdoor nieuwe resistentie-problemen tijdig onderkend, zodat interventie mogelijk is.

In de volgende hoofdstukken is de prevalentie en mate van resistentie van indicatorbacteriën in de faecale flora: *E. coli* en enterokokken, gebruikt om selectie en verspreiding van resistente bacteriën en resistentie-genen van nutsdieren naar de mens te onderzoeken. De resistentie-prevalentie tegen een bepaald antibioticum is het percentage monsters in een populatie, waarin *E. coli* of enterokokken, die resistent zijn tegen dat antibioticum, gevonden zijn. De mate van resistentie tegen een bepaald antibioticum in een faecesmonster is het percentage *E. coli* of enterokokken, dat resistent is tegen dat antibioticum.

In hoofdstuk III zijn de resultaten gepresenteerd van een onderzoek naar de prevalentie en mate van resistentie van indicatorbacteriën: *Escherichia coli* en enterokokken, in de faecale flora van slachtvarkens. De monsters waren verzameld aan de slachtlijn op vijf Nederlandse abattoirs en in Zweden. In de Nederlandse monsters was de prevalentie en mate van resistentie van de onderzochte indicatorbacteriën tegen antibiotica, die als AMGB gebruikt worden of als geneesmiddel, hoog. Er bestonden significante verschillen tussen de monsters afkomstig van de verschillende slachthuizen. Deze verschillen konden echter niet verklaard worden omdat geen gegevens over het antibioticumgebruik in de verschillende populaties beschikbaar waren. In de Zweedse monsters werd nauwelijks resistentie tegen de meeste AMGB gevonden en er werden geen vancomycine-resistente enterokokken (VRE) uit geïsoleerd. Vanwege het Zweedse verbod sedert 1986 op het gebruik van AMGB in veevoeder was dit te verwachten. De lagere resistentie tegen therapeutisch gebruikte antibiotica in de Zweedse monsters toonde duidelijk aan dat een verbod op AMGB niet

hoeft te leiden tot een toename van het veterinair gebruik van antibiotica. Bovendien bleek uit de verschillen tussen de Nederlandse en Zweedse monsters dat het bepalen van de prevalentie en mate van resistentie in faecesmonsters, verzameld op slachthuizen, een geschikte methode is om verschillen in antibioticumgebruik tussen populaties op te sporen.

In hoofdstuk IV is de prevalentie en mate van vancomycine-resistente enterokokken (VRE) bepaald in de faecale flora van kalkoenen en drie groepen mensen met een verschillende mate van intensiteit in het contact met kalkoenen: kalkoenhouders, kalkoenslachters en stadsbewoners. Bij kalkoenen, waarbij avoparcine als AMGB door het voer gemengd was, bleek de VRE-prevalentie significant hoger (62%) dan bij de dieren, die niet aan dat middel blootgesteld waren (8%). Bij de kalkoenhouders werd geen verschil gevonden tussen avoparcine gebruikers (37%) en niet-gebruikers (42%). De VRE-prevalentie in kalkoenslachters en stadsbewoners was respectievelijk 20% en 13%. Genotypering met behulp van pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) toonde aan dat de VRE-stammen, geïsoleerd uit mensen en kalkoenen, zeer heteroog waren. In twee gevallen werd echter op dezelfde boerderij een genotypisch identieke *E. faecium* stam geïsoleerd uit de faeces van de veehouder en een van zijn kalkoenen. Bovendien bevatten beide genotypen *E. faecium* een identieke variant van het *VanA*-gen cluster, dat nog niet eerder was aangetoond in VRE geïsoleerd uit mensen. Tevens werd deze variant van het *VanA*-gen ook gevonden in een aantal andere genotypen van VRE geïsoleerd uit mensen en kalkoenen. Dit bewijst dat niet alleen klonale overdracht van VRE van kalkoen naar mens plaats vindt maar ook dat verspreiding van vancomycine resistentie-genen, afkomstig van kalkoenstammen, naar enterokokken in de darmflora van mensen voorkomt.

In hoofdstuk V is de prevalentie en mate van resistentie tegen antibiotica onderzocht van enterokokken in de faecale flora van twee kippenpopulaties: legkippen en vleeskuikens en drie groepen mensen: legkippenhouders, vleeskuikenhouders en kippenslachters. Bij legkippen worden geen ABGM en relatief weinig antibiotica gebruikt; bij vleeskuikens daarentegen worden relatief veel antibiotica gebruikt. Zowel de prevalentie als de mate van resistentie tegen de

onderzochte antibiotica waren bij de enterokokken afkomstig van vleeskuikens hoger dan bij die van legkippen. Ook bij de vleeskuikenhouders en kippenslachters was de resistente prevalentie van de meeste antibiotica hoger dan bij legkippenhouders. Er bestond een duidelijke correlatie tussen de resistentie-prevalenties voor de verschillende antibiotica bij vleeskuikens en bij vleeskuikenhouders en kippenslachters. Van ieder VRE positief faecesmonster werd een isolaat getypeerd met behulp van PFGE. De gevonden genotypen in alle groepen waren erg heteroog. Echter op twee boerderijen werd zowel uit de ontlasting van de pluimveehouder als van een vleeskuiken een vancomycine-resistente *E. hirae* geïsoleerd, beiden met hetzelfde PFGE patroon. Moleculaire analyse van de *VanA*-genen van deze stammen toonde aan dat deze ook identiek waren en dat het varianten van het oorspronkelijke *VanA*-genencluster betrof, die voornamelijk bij pluimvee gevonden worden. Deze *VanA*-varianten werden niet alleen in isolaten met hetzelfde PFGE genotype gevonden, maar ook in andere genotypen, geïsoleerd uit mensen en kippen. Dit wijst duidelijk op resistentie-overdracht van kippen naar mensen. Dit kan klonale verspreiding van resistente stammen zijn, maar het lijkt dat overdracht van transposons van kippen enterokokken naar enterokokken uit de faecale flora van de mens meer voorkomt.

In hoofdstuk VI zijn de prevalentie en mate van resistentie van *E. coli* in de faecale flora van de populaties uit de hoofdstukken IV en V bepaald. Van monsters, waarin ciprofloxacin-resistente *E. coli* waren gevonden, werd bovendien een ciprofloxacin-resistente stam getypeerd met behulp van PFGE. De prevalentie en mate van resistentie was significant hoger bij kalkoenen en vleeskuikens, beide populaties met een relatief hoog antibioticumgebruik, dan bij legkippen. Ook bij kalkoen- en vleeskuikenhouders en pluimveeslachters was de resistentie hoger dan bij legkippenhouders. Bovendien werden dezelfde resistentie-patternen gevonden bij *E. coli* isolaten van kalkoenen, kalkoenhouders en -slachters en in die van vleeskuikens, vleeskuikenhouders en -slachters. Multiresistentie kwam veelvuldig voor bij isolaten afkomstig van kalkoenen, vleeskuikens en kalkoen- en vleeskuikenhouders, maar werd niet gevonden bij legkippen(houders). De genotypen van de ciprofloxacin-resistente *E. coli* uit de acht

populaties waren erg heterogeen. Echter op twee boerderijen werden identieke genotypen geïsoleerd uit faeces van de kalkoenhouder en zijn kalkoenen en ook uit een vleeskuikenhouder en een vleeskuiken, maar deze waren afkomstig van verschillende bedrijven. Bovendien waren drie ciprofloxacin-resistente stammen geïsoleerd uit kalkoenvlees met behulp van PFGE niet te onderscheiden van het isolaat uit de faeces van een kalkoenhouder in dit onderzoek. De resultaten van deze studie geven aan dat overdracht van resistente *E. coli* stammen van kippen naar mensen en uitwisseling van resistentie-plasmiden tussen kippen *E. coli* en *E. coli*-stammen in de darm van mensen regelmatig voorkomt.

In hoofdstuk VII is onderzocht of naast vermindering van antibioticumgebruik er ook andere mogelijkheden zijn om een lage prevalentie en mate van resistentie in de faecale flora van varkens te bewerkstelligen. Uit de literatuur was bekend dat een antibioticum, flavophospholipol, dat gebruikt wordt als AMGB, *in vitro* en *in vivo* onder experimentele condities de antibioticumresistentie bij *E. coli* bacteriën vermindert. Om vast te stellen of dit effect onder praktijkomstandigheden ook optreedt, werden op een boerderij drie groepen varkens afgemest, waarbij gedurende de laatste 12 weken voor het slachten voer werd verstrekt met en zonder AMGB. Een groep kreeg voer zonder AMGB (negatieve controle), een andere groep voer met 9 mg/kg flavophospholipol (studiegroep) en bij de derde groep (positieve controle) was avoparcine (15 mg/kg) aan het voer toegevoegd. De prevalentie en mate van resistentie tegen AMGB en antibiotica, die regelmatig therapeutisch gebruikt worden, werd bepaald bij de enterokokken en *E. coli* in faecesmonsters, individueel verzameld aan het begin en aan het einde van de studie. Vlak voor het begin van de studie waren de varkens bovendien gekoloniseerd met drie multiresistente *E. coli* stammen afkomstig van varkens door deze te mengen door het voer. Gedurende de studie nam de prevalentie en mate van resistentie van de *E. coli* van varkens in beide controlegroepen significant toe. Echter bij de varkens uit de flavophospholipol-groep bleef de prevalentie en mate van resistentie gelijk aan de waarden, gevonden in het begin van de studie. Bij het begin van de studie werden in de drie groepen geen VRE gevonden. Aan het einde van de studie was de

VRE prevalentie 44% en 41% in respectievelijk de negatieve controle- en flavophospholipol-groep, maar de mate van resistentie was in beide groepen erg laag, gemiddeld circa 1%. Bij dieren, die avoparcine kregen, was echter 72% van de varkens VRE drager en bij 57% van de dieren was de meerderheid van alle enterokokken in de faecale flora vancomycine resistent. Geconcludeerd werd dat flavophospholipol de vermeerdering en verspreiding van multiresistente *E. coli* in de darmflora van varkens voorkomt en dat avoparcine duidelijk selecteert voor VRE. Indien men in een veldproef, waarbij een groot aantal varkensbedrijven betrokken is, hetzelfde effect vindt, dient men een toekomstig verbod op het gebruik van flavophospholipol als veevoederadditief kritisch te heroverwegen. In een risico-baten-analyse zou het voordeel van een vermindering van de prevalentie en mate van resistentie in de faecale *E. coli* flora van varkens door het gebruik van flavophospholipol groter geacht kunnen worden dan het nadeel van een mogelijke selectie van resistente *E. faecalis* stammen en eventuele overdracht van dergelijke stammen naar mensen.

In hoofdstuk VIII is het effect onderzocht van het verbod op het gebruik van avoparcine in veevoerders in Nederland. Daartoe werd de prevalentie en mate van resistentie van enterokokken gemeten in faecesmonsters van slachtvarkens, slachtkuikens en gezonde vrijwilligers tegen drie voor de geneeskunst belangrijke antibiotica, nauw verwant en kruisresistent met AMGB. De faecesmonsters waren verzameld op dezelfde slachthuizen in 1997, vlak voor het verbod op het gebruik van avoparcine, en anderhalf jaar later in 1999. De faecesmonsters van de vrijwilligers waren afkomstig uit dezelfde twee regio's. De VRE prevalentie was in alle drie de populaties in 1999 significant lager dan in 1997. Bij vleeskuikens daalde de prevalentie van VRE van 80% naar 31%, bij varkens van 34% naar 17% en bij mensen van 12% naar 6%. De resistentie tegen erythromycine was gelijk gebleven, maar ook de resistentie tegen quinupristine-dalfopristine was significant gedaald, ondanks het feit dat het verwante AMGB, virginiamycine, ten tijde van het onderzoek nog niet verboden was. Het bleek echter dat in 1998 en 1999 virginiamycine in Nederland nauwelijks beschikbaar was vanwege productie-problemen bij de producent. Deze resultaten tonen duidelijk aan dat continue-

ring van het verbod op avoparcine niet alleen zal leiden tot een verdere verlaging en waarschijnlijk eradicatie van VRE uit de faecale flora van slachtdieren, maar ook van mensen. Aangezien het vancomycine-gebruik in Nederland tussen 1996 en 2000 praktisch gelijk is gebleven, is de waargenomen daling van de VRE-prevalentie bij mensen ook een bewijs dat VRE dragerschap in de faecale flora van de gezonde Nederlandse bevolking veroorzaakt wordt door avoparcine-gebruik bij dieren. De daling van de quinupristine-dalfopristine-resistentie duidt aan dat in geval van een verbod van andere AMGB een zelfde daling verwacht kan worden. Het is echter niet waarschijnlijk dat door het verbod op het gebruik van virginiamycine als AMGB deze resistentie volledig zal verdwijnen, omdat kruisresistentie bestaat met andere therapeutisch veel bij mens en dier gebruikte antibiotica: de lincosamides en macrolides.

In de conclusies wordt gesteld dat 60 jaar kwistig gebruik van antibiotica, met als gevolg een vloedgolf van resistente (potentieel) pathogene bacteriën, heeft geleid tot een erosie van de klinische effectiviteit van antibiotica. Men dient zich echter te realiseren, dat de waargenomen resistentie in (voorwaardelijk) pathogene bacteriën slechts het topje van de resistentie-ijsberg is. Er is tegenwoordig in de darmflora van mens en dier een geweldig reservoir van resistentie genen, waaruit pathogene bacteriën naar believen kunnen putten. Thans bestaat nationaal en internationaal bezorgdheid over de resistentie-toename en ziet men de noodzaak in om gezamenlijk en wereldwijd maatregelen te nemen ter beheersing van resistentie-ontwikkeling in bacteriën bij mens en dier. Uit de literatuur en ook uit het in dit proefschrift beschreven onderzoek blijkt duidelijk dat bacteriën uit de darmflora van mens en dier wat resistentie genen betreft in dezelfde vijver vissen. Resistente commensale bacteriën van nutsdieren kunnen direct, maar ook indirect, via de voedselketen, mensen besmetten, koloniseren of resistentie aan darmbacteriën van mensen en pathogene bacteriën overdragen. Daarom is het zorgvuldig gebruik van antibiotica bij nutsdieren niet alleen van

belang om de resistentie-problematiek in de diergeneeskunde te beheersen, maar ook een volksgezondheidsbelang! Een lage prevalentie en mate van resistentie in de faecale flora van nutsdieren moet daarom beschouwd worden als een veiligheidsgarantie en kwaliteitskenmerk binnen de integrale keten beheersing systemen, die de kwaliteit van producten van dierlijke oorsprong "van zaadje tot karbonaadje" pogen te waarborgen. Dit kan alleen bereikt worden door minder antibiotica te gebruiken. Daarvoor is het niet voldoende om alleen het gebruik van antibiotica op puur economische gronden als AMGB te stoppen, maar dient de dierlijke productiesector ook andere maatregelen te nemen om minder afhankelijk te worden van het gebruik van antibiotica. Echter beperking van het gebruik van antibiotica bij dieren alleen, zal de resistentie-problematiek in de medische sector niet oplossen. Het probleem in die sector wordt namelijk voornamelijk veroorzaakt door antibioticumgebruik door mensen. Het heeft echter geen zin om elkaar over en weer verwijten te maken en te beschuldigen. Een positievere benadering is samenwerking van alle betrokkenen om gezamenlijk strategieën te ontwerpen om het dreigende verlies van antibiotica uit het ons ter beschikking staande arsenaal geneesmiddelen te voorkomen. De Nederlandse veehouders en dierenartsen hebben duidelijk getoond dat zij hun verantwoordelijkheid voor de volksgezondheid serieus nemen door het op korte termijn afschaffen van het gebruik van AMGB en zich te confirmeren aan het afgesproken veterinaire antibioticumbeleid. Het toestaan van decontaminatie van karkassen van dieren na het slachten kan het risico van overdracht van bacteriële resistentie en pathogene bacteriën van dier naar mens op korte termijn zonder problemen nog verder doen dalen. Voorlichting aan de vleesverwerkende sector en de consument over de noodzaak van koeling, hygiënisch werken en een goede verhitte van vleesproducten, voordat men deze consumeert, blijft echter belangrijk ter voorkoming van overdracht van pathogene en/of resistente bacteriën van dier naar mens via voedingsmiddelen van dierlijke oorsprong.